

206



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

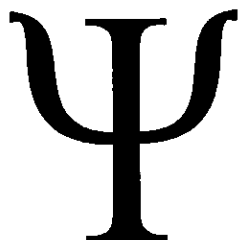
FACULTAD DE PSICOLOGIA

EFFECTOS DE ANTAGONISTAS COLINERGICOS
SELECTIVOS EN LA FORMACION DE LA MEMORIA.

0277653

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
LICENCIADA EN PSICOLOGIA
P R E S E N T A
LETICIA RAMIREZ LUGO

DIRECTOR DE TESIS: DR. FEDERICO BERMUDEZ RATTONI



MEXICO, D.F.



2001

EXAMENES PROFESIONALES
FAC. PSICOLOGIA.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

A MIS PADRES Y HERMANOS.....

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al **Dr. Federico Bermúdez Rattoni** por todo su apoyo incondicional, a la **Dra. María Isabel Miranda** por instruirme, apoyarme, por su inigualable paciencia, por su amistad y sobre todo les agradezco a los dos por brindarme la oportunidad de hacer investigación.

Agradezco al Dr. Antonio Zainos, Dra. Martha Lilia Escobar, Mtro. Gustavo Bacha y al Dr. Jose Luis Diaz Meza por sus valiosos comentarios y revisión de este trabajo.

Un ESPECIAL AGRADECIMIENTO a Tomás Rocha Rinza, por ser mi amigo, confidente y por todo lo que representa en mi vida.

A Ranier y Enrique que siempre han estado cuando más los he necesitado, por hacer más agradable el trabajo y sobre todo GRACIAS por su amistad.

A todos mis compañeros y amigos del laboratorio que hacen del trabajo un lugar grato, Sergio, Vanesa, Luis T., Carlitos, Gina, Oscar. GRACIAS a Luis N. quien me soporta más de 8 horas al día e incluso los fines de semana, y por toda su ayuda a este trabajo.

Gracias a Selenita que además de ser mi amiga, durante mis primeros años en esta Universidad fue una excelente compañera: su ayuda fue invaluable durante los primeros semestres de mi formación universitaria.

A todos mis amigos que de uno u otra forma siempre han estado conmigo: Ricardito, Tania y Quique, Marisela, Sergio Morales, Margarita, por supuesto no puedo olvidar a Nacho y Andrés que desde lejos me apoyan.

Así mismo, agradezco también a Oreste Carbajal y Yolanda Díaz de Castro por su amistad y su ayuda técnica en este trabajo.

INDICE

Resumen.	1
Introducción.	
Aprendizaje y memoria.	2
Memoria a corto y largo plazo	3
Sistema colinérgico.	4
El sistema colinérgico en aprendizaje y memoria.	6
Receptores muscarínicos.	10
Condicionamiento Aversivo al Sabor.	16
Corteza Insular.	20
Planteamiento del problema y objetivos.	22
Método del Experimento 1	24
Resultados Experimento1	
<i>Verificación histológica.</i>	28
<i>Liberación de ACh durante la aplicación de diferentes antagonistas muscarínicos.</i>	28
Método del Experimento 2	30
Resultados Experimento 2	
<i>Verificación histológica.</i>	33
<i>Antagonistas muscarínicos antes de la adquisición del CAS.</i>	34
<i>Antagonistas muscarínicos antes de la prueba del CAS.</i>	35
Discusión.	
Efectos en la liberación de ACh tras la infusión unilateral de antagonistas muscarínicos.	38
Efectos de la aplicación de antagonistas muscarínicos en el CAS.	39
Sistema colinérgico participa en la adquisición pero no en la evocación.	44
Bibliografía.	48

Resumen

La participación del la ACh en procesos de aprendizaje y memoria ha sido comprobada en varias tareas, particularmente durante las primeras etapas del aprendizaje. De particular importancia resultan ser los receptores muscarínicos en el sistema nervioso central (SNC), ya que su bloqueo provoca deficiencias en el aprendizaje de varias de estas tareas.

En el presente trabajo se determina el papel de los 5 diferentes subtipos de receptores muscarínicos (m1-m5) en la liberación de ACh en la corteza, así como en la formación de la memoria del CAS, tarea frecuentemente empleada en el estudio de procesos de aprendizaje y memoria. El bloqueo general de los receptores muscarínicos tiene una tendencia a aumentar la liberación de ACh en la corteza; por otra parte, el antagonista de los receptores post sinápticos no provocó cambios en la liberación cortical, y ambos bloquean la formación del CAS cuando son aplicados antes de la adquisición de la tarea. El bloqueo de los receptores muscarínicos pre sinápticos no afecta la formación de la memoria del CAS cuando es inyectado antes de su adquisición, e induce un aumento estadísticamente significativo en la liberación de ACh cortical. Ninguna de las manipulaciones farmacológicas antes de la evocación del CAS tuvo efectos sobre esta tarea. Se concluye que los receptores muscarínicos, participan en el procesamiento de adquisición del CAS y no en su fase de evocación y al menos en este paradigma no existe una relación directa entre el incremento en la liberación en la corteza con la eficiencia de la formación de la memoria.

Introducción

Aprendizaje y memoria.

Desde varias décadas atrás, uno de los procesos cognoscitivos que más han llamado la atención a los psicólogos y psicofisiólogos es la memoria; su estudio ha abarcado desde cómo los organismos aprenden hasta qué estructuras del sistema nervioso central participan en la formación de una nueva memoria, o cómo uno ya establecido cambia y bajo qué condiciones ambientales se adquiere un nuevo conocimiento.

El aprendizaje es comúnmente definido como un proceso mediante el cuál ocurren cambios relativamente permanentes en el potencial conductual del organismo como resultado de la experiencia (1). El organismo requiere almacenar cierta información relevante durante una experiencia dada, para de esta manera poder emplearla durante la siguiente ocasión en que se presente una experiencia similar. De este modo, puede definirse a la memoria como un proceso mediante el cuál el organismo puede almacenar de un modo relativamente permanente, la información que subyace al aprendizaje.

Otra definición se refiere al aprendizaje como a las representaciones internas durables dependientes de la experiencia, o modificación duradera en dichas representaciones que dependen de la experiencia; debido a estos cambios en la representación de estímulos se modifica el potencial conductual. Memoria es la retención a lo largo del tiempo, de representaciones que están en función de la experiencia y la

evocación se define como el uso de esas representaciones para generar operaciones conductuales (10).

Algunos definen aprendizaje como la habilidad que tienen los organismos de asociar los estímulos ambientales y sus consecuencias. (23)

Una definición que ayudará a entender con mayor facilidad el término memoria usado en este trabajo es aquel en el que la memoria puede ser considerado como la suma de varias fases:

- a) **Adquisición:** En esta fase los organismos están expuestos a cambios del medio físicos que constituyen los estímulos que los asocian o son contingentes.
- b) **Consolidación:** Durante esta fase hay activación de mecanismos que permiten una cierta permanencia de la experiencia concreta recién percibida.
- c) **Retención:** Es el fenómeno por medio del cual el organismo es capaz de expresar en el tiempo, los efectos del aprendizaje en varias ocasiones.
- d) **Evocación:** Se define como la expresión de conductas determinadas por experiencias de aprendizajes anteriores (52). En el presente trabajo a esta fase también se le llama prueba.

Memoria a corto y largo plazo.

El modelo de Atkinson y Shiffrin en 1968, supone que la información es procesada primero en paralelo por una serie de almacenes sensoriales muy breves, éstos transmiten la

información a un almacén a corto plazo de capacidad limitada el cual se comunica a su vez con un almacén a largo plazo.

Así pues, la información proveniente de la memoria sensorial puede decaer pasivamente o ser transferida a la memoria a corto plazo. El decaimiento o la transferencia de la información se encuentra mediado por un proceso atencivo, de modo que sólo aquellos estímulos a los que se les ha prestado atención serán procesados y por lo tanto transferidos a memoria a corto plazo. De acuerdo a este modelo, la memoria a corto plazo es un almacén de capacidad limitada. El almacén de memoria a largo plazo es aquél donde se acumula de una manera permanente, aquella información proveniente de memoria a corto plazo (2).

Sistema colinérgico.

Existe un gran número de estudios que proponen a la ACh como el principal neurotransmisor en procesos cognitivos, con una relevante participación en los procesos de aprendizaje y memoria. Este especial interés sobre la participación de la ACh tiene sentido si se toma en cuenta que en enfermedades neurodegenerativas que se caracterizan por una disminución de las capacidades cognitivas también existen pérdida de neuronas colinérgicas como en el caso de la enfermedad de Alzheimer.

La enfermedad de Alzheimer (EA), descrita por Alois Alzheimer en 1907, ha sido de gran interés en las últimas décadas para el estudio de procesos de aprendizaje y

memoria. Los pacientes con esta enfermedad muestran grandes deterioros en procesos cognitivos, principalmente presentan deficiencias mnemónicas.

Se ha propuesto que la pérdida de la memoria en estos pacientes es consecuencia de la disminución del neurotransmisor acetilcolina (ACh), debida al daño de neuronas colinérgicas (neuronas que producen y liberan ACh como neurotransmisor) del cerebro anterior basal (CAB). Un rasgo principal de la neuropatología de la EA es la degeneración de neuronas magno celulares colinérgicas del núcleo basalis de Meyert (nbM) y sus proyecciones corticales (3).

El telencéfalo contiene dos grandes subsistemas de cuerpos celulares colinérgicos, uno de ellos se encuentra en el tallo cerebral en la región del núcleo tegmental del pedúnculo pontino (PPTg) y el tegmentum pontino laterodorsal. El segundo subsistema es el cerebro anterior basal (CAB) que contiene un gran número de grupos de células colinérgicas que a su vez tienen proyecciones extensas hacia las allocortezas e isocortezas (ver figura 1). Los núcleos más rostrales colinérgicos del CAB son el núcleo medio septal y el núcleo vertical de la banda diagonal de Broca. Las fibras de estas células son positivas a la tinción de la enzima colin-acetiltransferasa (ChAT) en el cíngulo y viajan de manera caudal a través del fórnix para finalmente inervar la formación hipocampal. Los núcleos más caudales del CAB son los núcleos Basalis, sustancia inominata y los núcleos de la ansa lenticulares. En la parte media se encuentran una parte del brazo vertical de la banda diagonal de Broca, así como del área pre óptica magnocelulares, inervando las cortezas cinguladas y retrosplenial, además de ciertas estructuras allocorticales, particularmente el bulbo olfatorio, la amígdala junto con la corteza insular y piriforme. Las células

colinérgicas de los núcleos rostral y medio del CAB preferentemente inervan campos allocorticales, mientras las células colinérgicas en el núcleo caudal inervan isocortezas (ver cuadro 1)(56).

Cuadro 1. Resume las tres regiones en las que se puede dividir el cerebro anterior basal (CAB).

Cerebro anterior basal	Localización	Conexiones eferentes	Conexiones aferentes
Núcleo medio septal y el núcleo vertical de la banda diagonal de Broca	Fórnix	Hipocampo, cortezas entorhinal, perhinal, y retrosplenial. Núcleos interpedunculares.	Hipocampo, corteza entorhinal, hipotálamo, área ventral tegmental, núcleo laterodorsal tegmental, raphe dorsal y medio. Locus coruleus.
Núcleo de la banda horizontal de Broca y área magnocelular pre óptica	Cerebro anterior basal	Bulbo olfatorio, amígdala, corteza insular y cingulada.	Núcleo olfatorio, amígdala, allocortezas, hipotálamo lateral, área tegmental ventral, núcleos pedunculopontino y laterodorsal tegmental, raphe dorsal y medio y locus coruleus.
Núcleo Basalis Sustancia innominata Núcleo de la ansa lenticulares	Cápsula interna	Cortezas frontal, parietal, temporal y occipital	Cortezas parietal, frontal, temporal, tálamo intralaminar, sustancia negra, núcleo pedunculopontino tegmental, raphe dorsal y medio y locus coruleus

El sistema colinérgico en aprendizaje y memoria.

La acetilcolina es un neurotransmisor de bajo peso molecular que se elabora a partir de la colina, la cual la obtenemos de la dieta, y de la acetil-coenzima A, sintetizada en la mitocondria. La vía biosintética de la acetilcolina tiene una sola reacción enzimática

catalizada por la colin-acetiltransferasa (ChAT), se piensa que en el sistema nervioso, esta enzima existe principalmente en el citoplasma de la terminal nerviosa. La enzima que degrada a la acetilcolina es la acetilcolinesterasa (AChE)(30).

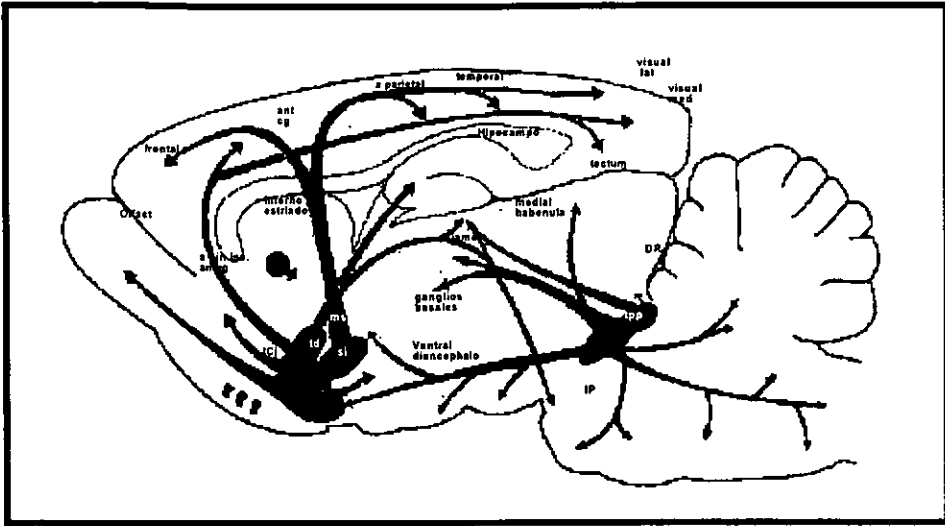


Figura 1. Representación esquemática del plano horizontal de los principales sistemas colinérgicos en el cerebro de los mamíferos (56). Como se observa en la figura, las neuronas colinérgicas centrales muestran dos esquemas de organización fundamentales: a) circuito de células locales, ejemplificadas por las interneuronas del núcleo caudado-putamen, núcleos acumbens, tubérculo olfatorio y el complejo de islotes de Calleja (ICj) y b) neuronas de proyección (por ejemplo aquellas que se conectan a dos o más regiones diferentes). De las proyecciones de neuronas colinérgicas que se interconectan con estructuras centrales, se han descrito dos complejos principales: a) el complejo colinérgico del cerebro anterior compuesto por neuronas positivas a ChAT en el núcleo septal medial (ms), el núcleo de la banda diagonal (td), sustancia innominata (si), el núcleo basalis (bas), así como proyecciones a todo el telencéfalo no estriado y b) el complejo colinérgico pontomesencefalotegmental compuesto por células inmunoreactivas a ChAT en el núcleo tegmental pedunculo pontino (tpp) y laterodorsal (dltn), proyectando ascendentemente al tálamo y a otros sitios diencefálicos y descendientemente a la formación reticular pontina y medular, al núcleo profundo cerebelar y vestibular. Otras abreviaturas: amígdala (amyg), corteza anterior cingulada (antcg), núcleo del nervio craneal dorsal (CrN), diencefalo (diencep), núcleo raphe dorsal (DR), corteza entorrinal (ento), corteza frontal (frontal), corteza insular (ins), locus coeruleus (LC), núcleo lateral reticular (LR), bulbo olfatorio (olfact), corteza periforme (pir), núcleo pontino (PN), corteza perirhinal (pr), corteza parietal (par), sustancia nigra (SN), núcleo espinal del nervio craneal 5 (Sp5), corteza temporal (temporal), corteza visual temporal (vis lat) corteza visual media (visual med).

El modelo de la EA en animales ha contribuido con suficiente información para postular la hipótesis geriátrica de la memoria. Esta hipótesis considera tres aspectos fundamentales en los que se basa su postulación: i) existen disfunciones específicas en marcadores colinérgicos en cerebros de sujetos que sufren de pérdida de memoria; ii) la interrupción artificial de las funciones colinérgicas en sujetos jóvenes inducen daños en el comportamiento que normalmente se presentan en sujetos de edad avanzada con problemas de pérdidas cognitivas; iii) el incremento en la actividad colinérgica, ayudaría al mejoramiento de los daños cognitivos relacionados con la edad (3).

Así pues, el papel del sistema colinérgico en aprendizaje y memoria ha sido bien establecido (7,12,13,17,18). Las evidencias obtenidas en tejido cerebral de animales y humanos, indican que las pérdidas observadas en marcadores bioquímicos de la pre y post sinapsis en receptores colinérgicos, correlacionan en respuesta a la edad y a las enfermedades neurodegenerativas relacionadas con ésta.

El nbM se encuentra ubicado dentro de la sustancia innominata de Reichert, y es la única estructura que provee de ACh a toda la corteza cerebral, por lo que las lesiones en este núcleo en animales han sido utilizadas como modelo para el estudio experimental de la participación del sistema colinérgico en los procesos de aprendizaje y memoria (17).

Debido a que las neuronas colinérgicas se encuentran mezcladas con neuronas no colinérgicas a lo largo de todo el CAB, los resultados obtenidos después del uso de diferentes excitotoxinas poco selectivas, no han esclarecido la función colinérgica precisa

en la adquisición o evocación de tareas conductuales. Se ha reportado que las lesiones del nbM con ácido iboténico ocasionan la muerte tanto de neuronas colinérgicas como de no colinérgicas y reduce los niveles de ACh en la corteza (12). Los efectos en el aprendizaje después de una lesión con ácido iboténico, son severos a pesar de su poca selectividad colinérgica (13). Por otro lado, se ha estudiado el efecto selectivo de la aplicación de AMPA (α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico) en el CAB lo que produce grandes pérdidas de neuronas colinérgicas y grandes reducciones en la actividad de ChAT. Este agente en el nbM produce una extensiva destrucción de las neuronas colinérgicas a la corteza, y se ha observado que no ocasiona pérdidas significativas en el aprendizaje en varios modelos conductuales (13,19,39).

En algunas revisiones ampliamente documentadas (7,17), se pone en evidencia la falta de relación de los deterioros conductuales producidos por las lesiones del nbM y la actividad colinérgica resultante que depende de la neuroexcitotoxina utilizada, como el NMDA, ácido iboténico, ácido quisquálico y AMPA. En general, se ha concluido que el daño disminuye conforme aumenta la selectividad colinérgica de la neurotoxina, encontrándose efectos delimitados sólo sobre algunas etapas de la adquisición o evocación de las tareas estudiadas.

En los últimos años se ha implementado una metodología para resolver el problema de la poca especificidad de las excitotoxinas utilizadas. Las lesiones con la inmunotoxina 192-IgG saporina afín a los receptores p75 que presentan, en su gran mayoría, las células colinérgicas del CAB, provoca una extensa deafferentación colinérgica del hipocampo y la

corteza, así mismo produce una pérdida total y específica de las neuronas colinérgicas inmunoreactivas a la expresión del receptor p75 presentes en el CAB (51).

Los resultados en paradigmas conductuales para el estudio de aprendizaje y memoria no fueron afectados por la infusión de la 192-IgG saporina, a pesar de la deafferentación colinérgica cortical e hipocampal. En la gran mayoría de las tareas se ha reportado que son afectadas cuando se hacen lesiones en el nbM con excitotoxinas no específicas (17).

Los resultados hasta ahora obtenidos con estas neurotoxinas sugieren una importante participación de otros sistemas de neurotransmisión dentro de la modulación ejercida por el CAB. Las neuronas GABAérgicas al parecer también tienen un papel relevante durante la formación de la memoria o procesos de atención, ya que se ha reportado que las inyecciones en el nbM de musimol, agonista GABAérgico, ocasionan pérdidas en pruebas de discriminación visual de 2 y 5 selecciones, parecidas a las observadas con lesiones de ácido iboténico (39).

Receptores muscarínicos.

Los estudios en primates y roedores viejos, así como en pacientes con demencia senil, han demostrado un decremento general en la densidad de receptores colinérgicos (55). Otros trabajos se han enfocado específicamente en el estudio de la actividad colinérgica durante el aprendizaje, mediada por los diferentes subtipos de receptores para ACh.

Los estudios realizados en el tejido cerebral de pacientes con la enfermedad de Alzheimer, y de animales seniles, han sugerido que no existen pérdidas en los receptores post sinápticos (31), aunque hay reportes de que éstos podrían no estar funcionando adecuadamente (21). En cuanto a los receptores pre sinápticos, se han observado reducciones significativas en cerebros de pacientes con Alzheimer (20).

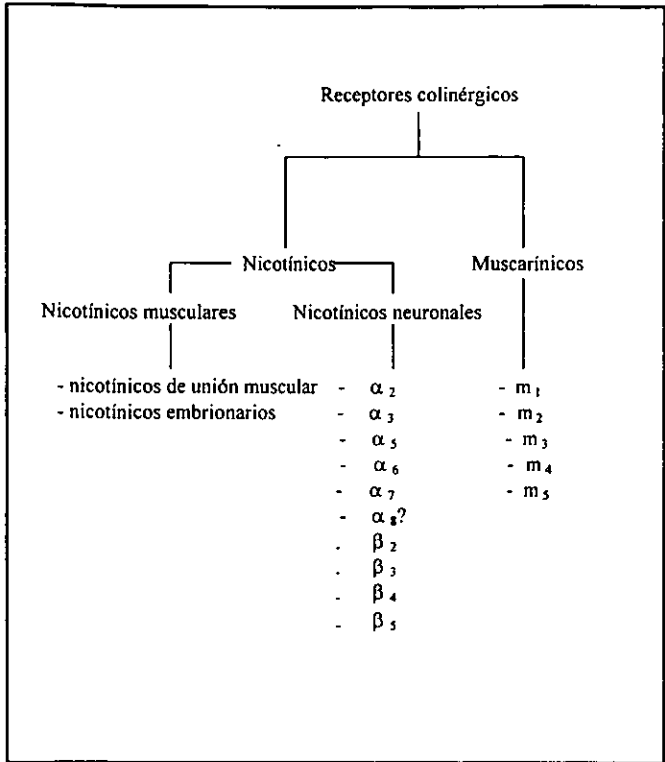
La acción de la acetilcolina es mediada por receptores nicotínicos y muscarínicos, que han sido estudiados principalmente por técnicas autoradiográficas (56).

La evidencia farmacológica, bioquímica, inmunológica, y los estudios con técnicas de biología molecular indican la existencia de cinco genes diferentes que codifican para cada uno de los cinco receptores muscarínicos de ACh, llamados m1-m5, los receptores m1, m3, m4 y m5 se han descrito en la post sinapsis, los receptores m2 se han descrito como autoreceptores¹, ubicados en la pre sinapsis (8).

Algunos estudios (44,55) se ha enfocado en el estudio de la liberación de ACh que es consecuencia de la aplicación de antagonistas muscarínicos y nicotínicos, utilizando la técnica de microdiálisis en libre movimiento en áreas que se han relacionado con el aprendizaje como hipocampo y cortezas.

¹ El termino autoreceptor es aplicado a los receptores presentes en una neurona para un neurotransmisor liberado por esa neurona. Los autoreceptores se han observado en la membrana del soma y las dendritas además de la membrana de los axones, cerca de los sitios de la liberación del neurotransmisor. Pueden alterar la síntesis de los neurotransmisores, un efecto que puede indirectamente modular su liberación (29).

Cuadro 2. Clasificación de los receptores colinérgicos (50).



La microdiálisis es una técnica de muestreo bioanalítica que monitorea la química del espacio extracelular de un tejido (ver figura 2). El muestreo en microdiálisis se lleva a cabo mediante la implantación de una membrana de diálisis en el tejido vivo. Que está conectada a un tubo a través del cual corre un líquido de perfusión isotónico con un flujo constante. La diferencia en la concentración de un químico en el tejido y la concentración que existe en el fluido crea un gradiente de concentración que induce el paso de aquél a través de la membrana de diálisis. Dado que la difusión es bidireccional, el mismo fluido

puede tanto registrar, como infundir un químico en el tejido blanco. Este proceso se puede realizar en tejidos de animales en libre movimiento y puede tener una duración que va desde pocos minutos hasta varios días. Una vez obtenidas las muestras se deben analizar en cromatografía líquida de alta resolución cuyas siglas en inglés son HPLC. La HPLC, al igual que las demás técnicas cromatográficas, es un método de separación de mezclas que se basa en la afinidad relativa de los analitos² por dos fases estacionaria y móvil: el analito más afín por la fase estacionaria es el que será retenido mas fuertemente en la columna y cuyo pico cromatográfico aparecerá a un tiempo de retención mayor. En lo que se distingue la HPLC de las demás cromatografías es que la fase móvil es líquida y la cantidad que se utiliza de esta en un ensayo es generalmente menor que en las demás.

En la corteza parietal y en el hipocampo dorsal han sido infundidos, por medio de microdiálisis en libre movimiento, escopolamina, AFDX 384 (bloqueador de los m2, m4), y pirenzepina (bloqueador de m1) obteniéndose incrementos significativos en la liberación de ACh (55). En la corteza fronto parietal la aplicación de atropina (bloqueador no específico de los receptores muscarínicos) y varios antagonistas muscarínicos a m2 (ADFX 116, AFDX 384, AQRA 741) estimularon potencialmente, dependiente a la concentración, la liberación en vivo de ACh (55). Sin embargo, con la aplicación de pirenzepina (bloqueador m1) y 4-DAMP (bloqueador a m3) se observó un incremento en la liberación de Ach, pero su efecto fue menos prominente y más variable (43). En CA1, región en el hipocampo, la aplicación de antagonistas muscarínicos m2 elevan los niveles de Ach de manera dependiente a una curva dosis respuesta (53).

² Un analito es cualquier sustancia que es susceptible de ser determinada tanto cuantitativa como cualitativamente mediante técnicas de análisis químico.

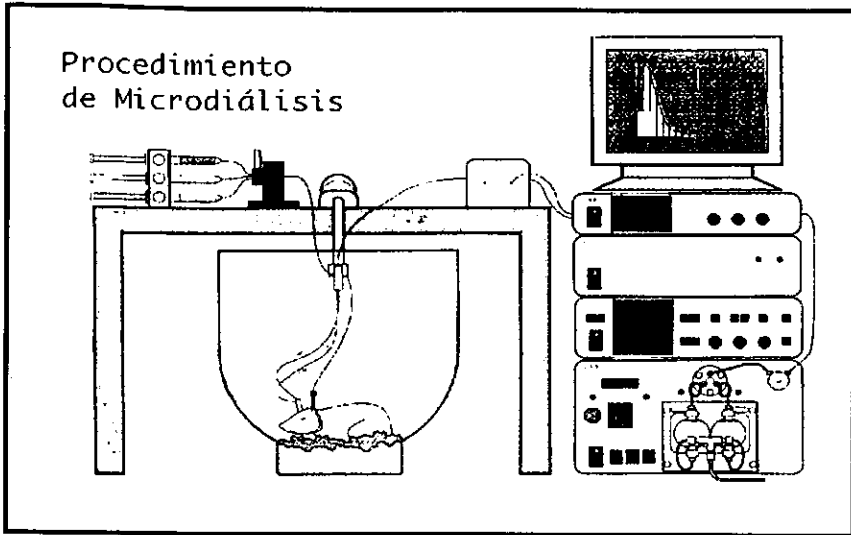


Figura 2. Esquema del procedimiento de microdiálisis. Una vez realizada la diálisis las muestras son analizadas en cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

En humanos (9,42) y en animales (40) la utilización de un antagonista general de los receptores muscarínicos como la escopolamina produce daños en la memoria. La escopolamina bloquea los receptores en la post-sinapsis y la pre - sinapsis en el sistema nervioso central. Actuando en los receptores post-sinápticos este antagonista muscarínico bloquea la neurotransmisión de ACh. Con los autoreceptores en la pre sinapsis, la escopolamina bloquea la inhibición de la liberación de ACh (49,54). Por otra parte, la aplicación de inhibidores de colinesterasa que incrementarían la señal sináptica, como la flostigmina mejora el desempeño en algunas tareas de aprendizaje y memoria (13,19).

Los receptores muscarínicos m1 (ubicados en la post sinapsis) están asociados con el deterioro de la memoria y los receptores muscarínicos m2 (ubicados en la pre sinapsis,

autoreceptores) con el mejoramiento de la misma, incluyendo la atenuación de los efectos amnésicos provocados por antagonistas de los receptores m1 (11).

Se ha demostrado que el receptor muscarínico del tipo m2 es principalmente responsable de la modulación en las terminales nerviosas en la corteza cerebral y el estriado. Además se ha visto que el antagonista muscarínico para m2 BiBN-99 es capaz de mejorar la liberación de ACh y por tanto reestablecer ejecuciones cognitivas dañadas (44).

Además se ha visto la participación de los receptores muscarínicos en paradigmas conductuales, por ejemplo en tareas como el reconocimiento de objetos o prevención pasiva la aplicación sistémica de escopolamina en ratas jóvenes irrumpe con su aprendizaje (55). Estos daños fueron remediados por la inyección sistémica de un antagonista muscarínico m2 (AFDX 344), resultados similares se obtuvieron con la infusión de este antagonista en ratas viejas, las cuales no pueden aprender estas tareas (55). La aplicación de un antagonista de los autoreceptores muscarínicos incrementa la liberación de ACh, compensando los cambios producidos por un bloqueo de la escopolamina o los cambios generados por la edad.

Un paradigma que se ha utilizado en el estudio de los procesos de memoria y aprendizaje es el conocido como condicionamiento aversivo a los sabores.

Condicionamiento Aversivo al Sabor.

La interacción de los estímulos relacionados con los alimentos y la retroalimentación visceral que siguen a la ingestión, determinan en gran parte la conducta consumatoria en los animales (23). La forma en que los animales reaccionan ante la retroalimentación aversiva de las toxinas alimenticias, a diferencia de cómo lo hacen ante el dolor producido por el ataque de un depredador, tiene un significado evolutivo (22). En esta forma los animales son capaces de asociar sabores arbitrarios con los efectos nutritivos o tóxicos, después de que han sido ingeridos. Por lo tanto los organismos deben seleccionar alimentos nutritivos y evitar alimentos que contengan toxinas.

El Condicionamiento Aversivo a los Sabores (CAS) es una forma de aprendizaje fácil de implementar en el laboratorio, por medio del cual los animales adquieren aversión a un sabor determinado cuando este es seguido por malestar gástrico (ver figura 3). Este condicionamiento puede tolerar retraso entre el sabor (estímulo condicionado) y el malestar (estímulo incondicionado) por varias horas (57).

En la rata los sustratos neuronales del CAS han sido anatómicamente definidos (Ver figura 4), lo cual es una ventaja que da el uso de este paradigma.

Varios estudios anatómicos han indicado que la convergencia de la información de los estímulos gustativos y viscerales se puede encontrar en varias partes del sistema nervioso central.

Condicionamiento Aversivo a los Sabores

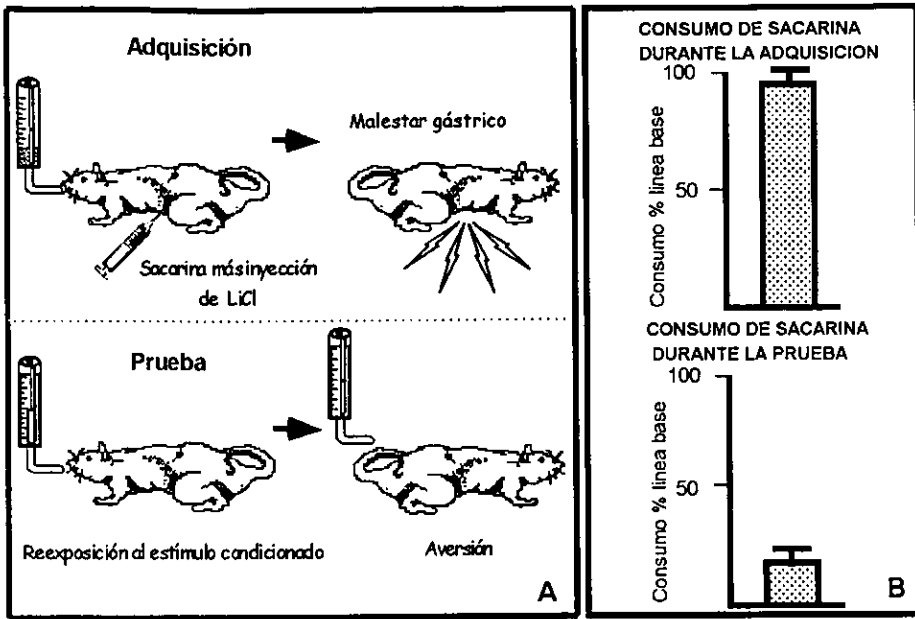


Figura 3. (A) Muestra el procedimiento del condicionamiento aversivo a los sabores. En la adquisición del CAS los animales son expuesto a un sabor novedoso, en este caso es la sacarina 0.1 % (estímulo condicionado) durante una sesión de 15 minutos. Treinta minutos después se les aplica una inyección vía intraperitoneal de cloruro de litio, LiCl, (0.4M) (estímulo incondicionado) para provocar un malestar gastrointestinal. Cuatro días después de la adquisición, el animal es reexpuesto al estímulo condicionado (sacarina). (B) representa el consumo de sacarina de un animal con cerebro intacto.

Cuando un mamífero prueba un sabor novedoso, las aferencias gustativas que vienen a través de los nervios VII y IX y de la faringe y la laringe por el nervio X, establecen relevos de primer orden en los dos tercios rostrales del núcleo del tracto solitario (NTS rostral) (4). El segundo relevo es el núcleo parabraquial del puente (PBN). Los axones de las neuronas de la zona gustativa de la parte rostral del NTS ascienden ipsilateralmente a través de la formación reticular al PBN, principalmente al sub núcleo medial del PBN (57).

Existen dos principales proyecciones del PBN, la principal proyección de estas fibras termina en la parte ventral del cerebro medio, incluyendo la amígdala a sus núcleos central (AC) y basolateral (ABL), el hipotálamo lateral (HL), y la sustancia innominata. La segunda proyección asciende ipsilateralmente por el cordón tegmental central y proyecta hacia el núcleo ventroposteriomedial del tálamo (VPM) que tiene proyecciones a la corteza insular (CI).

Al núcleo del tracto solitario caudal (NTS caudal) llega la información del estímulo incondicionado (LiCl) a través de las ramas hepáticas del nervio vago (sensibles a la irritación gástrica), así como aferencias del área postrema (que es sensible a toxinas que vienen de la circulación periférica, y del sistema vestibular).

Del NTS caudal hay proyecciones hacia diversas estructuras del cerebro basal como el hipocampo, la sustancia innominata, y el hipotálamo lateral, también tiene proyecciones al PBN lateral, específicamente a su parte rostral, el cual tiene proyecciones hacia el tálamo ventroposteriolateral (VPL) de donde proyecta hacia la CI (4).

El hipotálamo lateral, con la información gustativa y la información visceral, proyecta al núcleo de la base *stria terminalis* (BNST), el cual a su vez se encuentra comunicado con la corteza Insular (CI) (57).

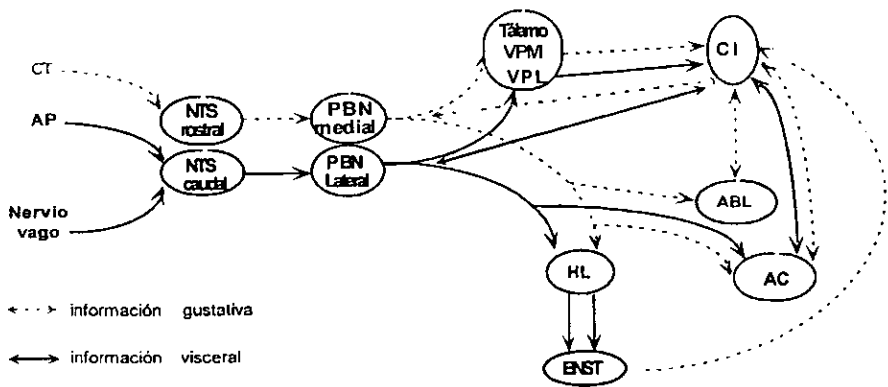


Figura 4. Esquema de las principales vías de procesamiento de los estímulos gustativos y viscerales en la rata. Abreviaturas: corda timpáni (CT), área postrema (AP), núcleo del tracto solitario rostral (NTS rostral) y caudal (NTS caudal), núcleo del parabraquial lateral (PBN lateral) y medial (PBN medial), tálamo ventroposteriomedial (VPM) y núcleo del tálamo ventroposteriolateral (VPL), corteza insular (CI), hipotálamo lateral (HL), núcleo de la base de la estría terminalis (BNTS), amígdala central (AC), amígdala basolateral (ABL).

El PBN lateral tiene proyecciones hacia la amígdala, al núcleo central (AC) el cuál también tiene proyecciones a la corteza insular (57).

La corteza gustativa está localizada en la corteza insular agranular. Se ha establecido que la CI es la región donde se lleva acabo la integración de los estímulos involucrados en el CAS (57).

Corteza Insular.

En los años 70's se realizaron los primeros experimentos con relación a la participación de la CI en el aprendizaje y la memoria, utilizando un modelo conductual descrito por John García en 1954, conocido como condicionamiento aversivo a los sabores, que es uno de los paradigmas utilizados en el estudio molecular, celular y anatómico del aprendizaje.

La corteza insular (CI) es una estructura con múltiples ventajas para el estudio del aprendizaje y la memoria. En ratas es un área que se extiende desde la corteza frontal lateral hacia la corteza perhinal en dirección rostrocaudal y del límite ventral de la corteza somatosensorial hacia la corteza piriforme en la dirección dorsoventral. Es una región con una extensión de 1mm de ancho y 3 mm de largo (ver figura 5)(48).

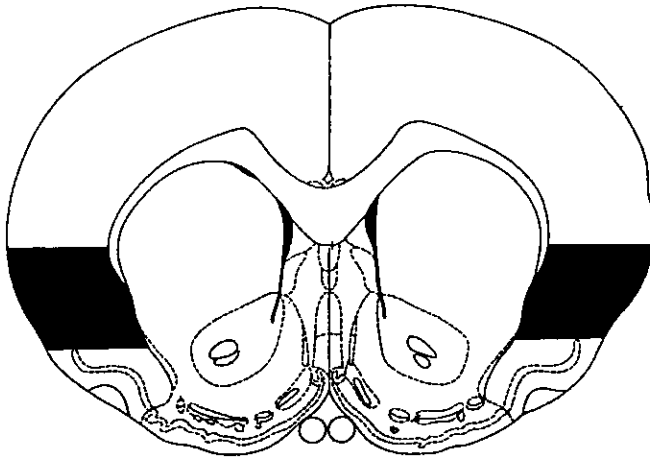


Figura 5. La zona sombreada representa la Corteza Insular en un en corte coronal de cerebro de rata.

La CI (áreas 13 y 14 de Krieg en ratas) ha sido referida como una corteza visceral, porque recibe información tanto gustativa como visceral proveniente del tálamo y de otras estructuras subcorticales y está involucrada en reacciones automáticas y de respuestas al estrés (4). Se ha reportado también, que la CI recibe información del sistema límbico y estimulación primaria sensorial gustativa que no ha sido registrada en ninguna otra área de la corteza cerebral. Las principales conexiones a la CI que provienen del sistema límbico, y que son de importancia para la integración de los procesos asociativos, son las aferencias de la amígdala, el núcleo dorso medial del tálamo y la corteza pre frontal (6).

Las lesiones de la CI producidas antes o después de la adquisición del CAS interfieren con este aprendizaje (5,6).

La corteza insular recibe aferencias colinérgicas del Núcleo Basal Magnocelular (nbM) en ratas o núcleo basal de Meyert en humanos (56). Dentro del nbM se encuentran dos grupos celulares, aquellos que presentan afinidad por el receptor de baja afinidad p75 de NGF (factor de crecimiento neural) formando la vía llamada básalo- cortical, y el otro grupo celular que son negativos a dicho receptor formando la vía básalo-amígdala (28).

Se ha reportado que las lesiones del nbM con ácido quisquálico, provocan una reducción significativa de la actividad de ChAT en la CI e impiden la capacidad de adquirir y evocar el CAS (33). En comparación, cuando dichas lesiones se efectúan con NMDA, sólo provocan la pérdida de la capacidad para adquirir el CAS y afectan la

adquisición del laberinto de agua de Morris, sin tener efecto alguno cuando las lesiones se hacen después de haber adquirido la tarea (27).

Planteamiento del problema y objetivos.

Como ya se mencionó, existe evidencia de la participación colinérgica en procesos de aprendizaje; se sabe que la aplicación de los antagonistas generales y específicos de los receptores muscarínicos, tienen efecto en la liberación de ACh cortical e hipocampal. La CI es una estructura que juega un papel importante en la formación del CAS y la información acerca de la participación de los receptores muscarínicos en la CI en el CAS es escasa. Se sabe que la aplicación de antagonistas muscarínicos, como la escopolamina, atropina, el AFDX 116 y la pirenzepina en la CI, antes de la adquisición del CAS, bloquean la memoria (40). Aún no se ha reportado cual es el efecto en la liberación de ACh a consecuencia de la aplicación de antagonistas muscarínicos en Corteza Insular.

El objetivo de esta tesis fue evaluar las consecuencias del bloqueo específico en la corteza insular, de los diferentes tipos de receptores muscarínicos en la liberación de ACh cortical, así como su efecto en el CAS.

Para lo cual el trabajo se dividió en dos experimentos que tuvieron como objetivos: evaluar el efecto de la aplicación unilateral de escopolamina, pirenzepina y AFDX en la liberación de ACh cortical en CI y determinar las consecuencias de las microinyecciones bilaterales de estos antagonistas muscarínicos en la corteza insular durante la formación de la memoria y la evocación del condicionamiento aversivo a los sabores.

Se utilizaron los siguientes antagonistas muscarínicos para la realización de este trabajo:

1. Escopolamina, un antagonista de los receptores muscarínicos general (m1-m5).
2. AFDX 116, un antagonista de los receptores relativamente selectivo m2 (m2/m4)
3. Pirenzepina, un antagonista de los receptores relativamente selectivo m1(m1/m3)

METODO

Experimento 1

Material y método:

Sujetos.

Para evitar las variables consecuentes del ciclo estral que presentan las ratas hembras, en todos los experimentos de esta tesis se utilizaron ratas machos. Por tanto, se usaron 30 ratas machos de la cepa Wistar, de pesos entre 250 y 325g, al momento de realizarse la cirugía. Se mantuvieron todo el tiempo en cajas independientes con agua y comida ad libitum, en un ciclo luz-oscuridad de 12 hrs.

Implantación de guías cánulas.

Todos los animales fueron anestesiados con pentobarbital (50mg/kg) y fueron implantados con una cánula en la corteza insular izquierda, de acuerdo a procedimientos estereotáxicos [anteroposterior (AP)= +1.2mm, lateral (L)= +5.5mm de bregma, ventral (V)= -5.5 de dura]. La guía cánula fue colocada al cráneo con un soporte de tres tornillos y cemento dental.

Fármacos.

Se utilizó una solución artificial de líquido cefalorraquídeo (solución de Ringer) (118 mM NaCl / 4.7 mM KCl / 2.5 mM CaCl₂) como vehículo. N- Butil Bromuro de

escopolamina, 136 mM, (Sigma). AFDX 116, 0.5 mM, Di clorhidrato de pirenzepina, 100 mM, (Sigma). Las soluciones fueron diluidas en solución de Ringer a su concentración final.

Procedimiento de microdiálisis.

La diálisis se realizó colocando la sonda de diálisis en la guía cánula (sonda de diálisis CMA/12 para CMA/ micro diálisis, con 3 mm de longitud de la membrana). La sonda fue constantemente perfundida con solución de Ringer que contenía 10mM de bromuro de neostigmina (sigma) para hacer posible la detección de la ACh en el análisis cromatográfico.

La velocidad de flujo fue de 2 μ l/min utilizando una bomba de micro infusión (CMA/ microdiálisis).

La figura 6 resume el procedimiento del experimento 1. Los primeros 45 minutos de muestras fueron descartados, y 8 muestras fueron colectadas cada 15 min. (30 μ l/muestra), se guardaron las muestras a una temperatura de -80°C hasta el momento del análisis por cromatografía de líquidos de alta resolución (high performance liquid chromatography, HPLC).

Los animales fueron divididos en 4 grupos:

Grupo Escopolamina (n = 5)

Grupo Pirenzepina (n = 5)

Grupo AFDX-116 (n = 12)

Grupo control vehículo (Solución de Ringer). (n = 5)

En las dos primeras muestras se perfundi6 solución de Ringer en todos los grupos. Durante la tercera y cuarta muestra se cambio la infusi6n de soluci6n de Ringer por la infusi6n del f6rmaco correspondiente al grupo, excepto en el grupo control veh6culo, en el cual se continuo con la perfusi6n de Ringer. El resto de las muestras en todos los grupos continuaron con la infusi6n de soluci6n de Ringer.

Medici6n de ACh.

Para el an6lisis de los niveles de ACh fue usado un cromat6grafo de l6quidos, HPLC (Beckman) con detector electrol6tico (BAS, West Lafayette, IN). Las muestras fueron inyectadas dentro de una fase m6vil [50mM de buffer fosfato de sodio (pH 8.5), y reactivo Kathon (BAS, West Lafayette, IN)]. La colina y acetilcolina fueron transformados en peroxido de hidrogeno y betaína mediante un reactor enzim6tico acoplado a la columna de separaci6n (BAS, West Lafayette, IN). El per6xido de hidr6geno se detect6 electroqu6micamente por un electrodo de platino a 500 mV(vs. Ag/AgCl). El l6mite de detecci6n fue aproximadamente 0.1pmol.

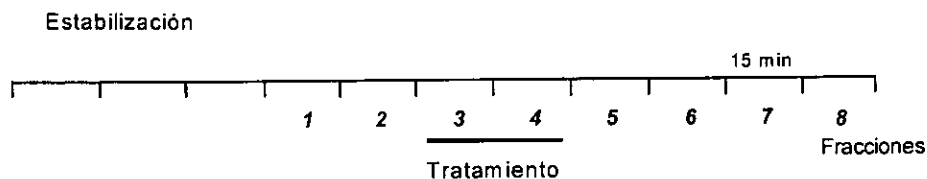
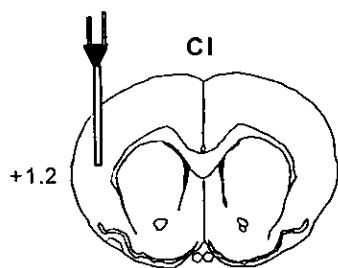


Figura 6. Muestra el procedimiento de microdialisis en el primer experimento. Cada fracción tiene una duración de 15 minutos. Se tomaron 8 fracciones. La infusión de los antagonistas muscarínicos fue durante las fracciones 3 y 4.

Histología.

Con el objeto de confirmar el lugar de la microinyección se realizó una técnica histológica. Para este fin, una vez concluido el experimento, los animales fueron anestesiados con pentobarbital y perfundidos a través de la aorta ascendente con una solución salina (0.15 M) y después con paraformaldehído al 4 % en buffer fosfato (0.15 M, pH 7.4). Los cerebros se mantuvieron 24 horas en solución de paraformaldehído para después ser cambiados a una solución al 20 % de sacarosa en buffer y fueron almacenados a una temperatura de 4°C hasta que fueron cortados. Se realizaron cortes coronales (40 μ m) de corteza insular. Los cortes fueron montados en laminillas para después ser procesados con la técnica de tinción de violeta de cresilo y ser vistos al microscopio.

RESULTADOS EXPERIMENTO 1

Verificación histológica:

En todos los grupos la guía cánula y la membrana fueron ubicados en CI. Tres animales fueron descartados de este estudio por la localización dudosa de la cánula.

Liberación de ACh durante la aplicación de diferentes antagonistas muscarínicos:

En todos los casos de comparación estadística entre grupos se utilizó una prueba estadística ANOVA de una vía con comparaciones post hoc de Fisher.

El análisis estadístico ANOVA muestra que entre los grupos, la liberación de ACh en corteza insular existen diferencias estadísticamente significativas a partir de la fracción 4 y hasta la fracción 8, $F(3,23) = 2.471$ $p < 0.05$, $F(3,23) = 3.074$ $p < 0.05$, $F(3,23) = 6.552$ $p < 0.01$, $F(3,23) = 7.147$ $p < 0.01$, $F(3,23) = 6.062$ $p < 0.01$ respectivamente.

El análisis post-hoc con la prueba de Fisher en estas fracciones mostró diferencias significativas en la liberación de ACh en la CI entre el grupo de AFDX y los otros grupos (ver figura 7). En la fracción 4 y 5 se encontraron diferencias significativas entre el grupo de AFDX y pirenzepina, así como con el grupo de Ringer, con valores de $p < 0.05$ en ambos casos. Para las fracciones 6, 7 y 8 se obtuvieron diferencias significativas entre el grupo de AFDX y los demás grupos, con valores de $p < 0.01$.

Como se puede observar en la figura 7, en la fracción 4 del grupo de escopolamina se muestra que existe una tendencia en el incremento de la liberación de ACh comparado con el grupo Ringer ($P < 0.2305$).

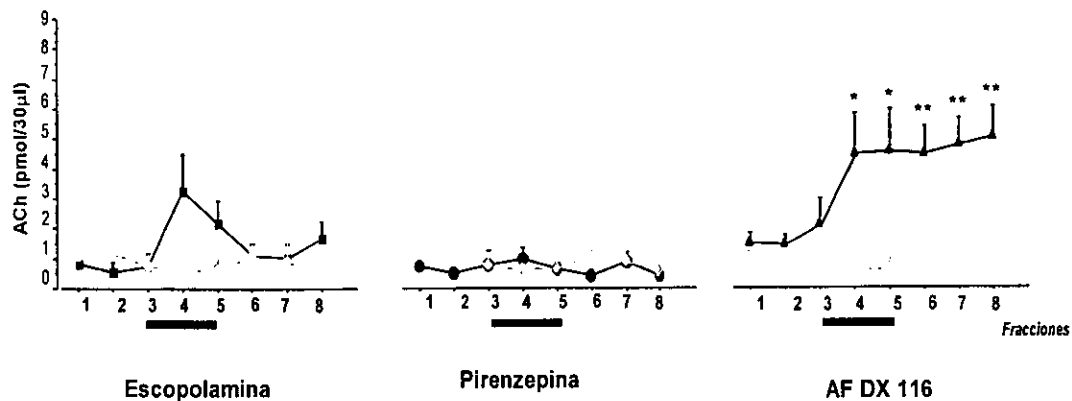


Figura 7. Muestra los resultados en la liberación de ACh basal a consecuencia de la aplicación de antagonistas muscarínicos en CI. El análisis estadístico ANOVA muestra que entre los grupos existen diferencias significativas a partir de la fracción 4 y hasta la fracción 8, $F(3,23) = 2.471$ $p < 0.05$, $F(3,23) = 3.074$ $p < 0.05$, $F(3,23) = 6.552$ $p < 0.01$, $F(3,23) = 7.147$ $p < 0.01$, $F(3,23) = 6.062$ $p < 0.01$ respectivamente. El análisis post-hoc con la prueba de Fisher en estas fracciones mostró diferencias significativas en la liberación de ACh en la CI entre el grupo de AFDX y los otros grupos, — = aplicación del antagonista.

Experimento 2

Material y método:

Sujetos.

50 ratas machos de la cepa Wistar, de pesos entre 250 y 325g, al momento de realizarse la cirugía. Se mantuvieron todo el tiempo en un ciclo luz-oscuridad de 12 horas, en cajas independientes con agua y comida ad libitum, excepto cuando el paradigma conductual utilizado requería mantenerlos privados de agua.

Implantación de guías cánulas.

Todos los animales fueron anestesiados con pentobarbital (50mg/kg) y fueron implantadas cánulas bilaterales, de acuerdo a procedimientos estereotáxicos, sobre CI [anteroposterior (AP)= +1.2mm, lateral (L)= +-5.5mm, ventral (V)= -3.5 a partir de bregma]. Las guías cánulas fueron colocadas al cráneo con un soporte de dos tornillos y fijadas con cemento dental.

Fármacos.

Se utilizó una solución artificial de líquido cefalorraquídeo (solución de Ringer) (118 mM NaCl / 4.7 mM KCl / 2.5 mM CaCl₂) como vehículo. N- Butil Bromuro de escopolamina, 136 mM, (Sigma). AFDX 116, 0.5 mM, Di clorhidrato de pirenzepina, 100

mM. (Sigma). Las soluciones fueron diluidas en solución de Ringer a su concentración final.

La figura 8 resume el procedimiento llevado a cabo en el experimento 2.

Procedimiento conductual.

Cuatro o cinco días después de la cirugía los animales fueron privados de agua 24 horas antes de comenzar el procedimiento conductual. Durante los siguientes 5 días se registró el consumo de agua cada 24 horas dando de beber agua en sesiones de 15 min en probetas graduadas (**línea base**). En la sexta sesión se les presentó un sabor nuevo (sacarina 0.1%) durante 15 minutos; 30 minutos después se les aplicó una inyección vía intra peritoneal de cloruro de litio (0.4 M) para producir malestar gástrico (**adquisición**). Durante las tres siguientes sesiones se mantuvo el mismo procedimiento de consumo basal de agua. Cuatro días después de la adquisición se presentó a los animales, sacarina al 0.1% en una sesión de 15 minutos (**Prueba o evocación**). Todos los días se registro el consumo de agua o sacarina.

Procedimiento de microinyecciones.

Los animales fueron divididos en 2 grupos. Grupo A, microinyecciones bilaterales en CI 20 minutos antes de la presentación de la sacarina en la adquisición y Grupo B, microinyecciones bilaterales en CI 20 minutos antes de la presentación de la sacarina en la prueba o evocación del CAS. Tanto el criterio para los tiempos de inyección de los

antagonistas como las dosis, fueron obtenidos de Naor, N (1996)(40). Estos grupos a su vez fueron divididos en 4, dependiendo del fármaco inyectado como se muestra en el cuadro 3.

Cuadro 3. Muestra los grupos en los que se dividió el experimento 2.

Grupo A Inyección antes de ADQUISICION	Escopolamina n= 7 Pirenzepina n= 8 AFDX-116 n= 5 control Vehículo n=8
Grupo B Inyección antes de la EVOCACIÓN O PRUEBA	Escopolamina n= 4 Pirenzepina n= 5 AFDX-116 n= 5 control Vehículo n= 4

El inyector fue conectado a un tubo de teflón, conectado a su vez con una microjeringa Halmiton de 10 μ l montada en una bomba de inyección. Se inyectó un volumen de 1 μ l de fármaco o vehículo en 60 segundos sin ocasionar daño al tejido.

Los inyectores tenían un largo adicional a la guía cánula de 3 mm (total: 12mm) para llegar a la corteza insular.

Histología.

La histología se realizó de la misma forma que en el experimento anterior.

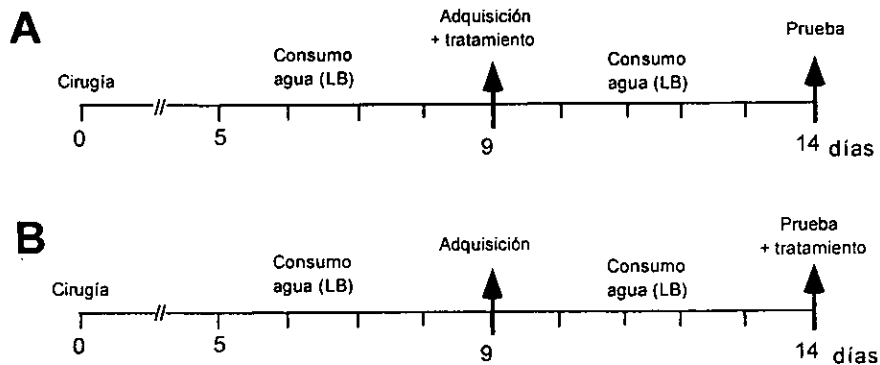
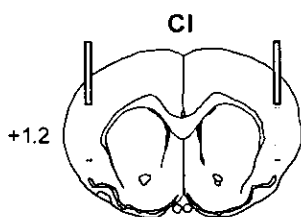


Figura 8. Muestra el procedimiento del experimento 2. A) Procedimiento para el grupo en el que los animales recibieron la aplicación de los antagonistas muscarínicos antes de la adquisición del CAS. B) Procedimiento para el grupo en el que los animales recibieron la aplicación del antagonista muscarínico antes de la evocación o prueba del CAS. LB= línea base

RESULTADOS EXPERIMENTO 2

Verificación histológica:

Solo cuatro animales fueron descartados del estudio por tener la cánula mal ubicada.

La inyección en el resto de los animales fue hecha en CI.

Antagonistas muscarínicos antes de la adquisición del CAS.

Se utilizó la disminución en el consumo de sacarina en la prueba con respecto al consumo de agua en la línea base para tomar el parámetro de aversión, obteniéndose el porcentaje de línea base = consumo de solución sacarina x100/ media del consumo en la línea base.

En todos los casos de comparación estadística entre grupos se utilizó una prueba estadística ANOVA de una vía con comparaciones post-hoc de Fisher.

Los resultados de los efectos de la aplicación de antagonistas muscarínicos en CI antes de la adquisición del CAS se muestran en la figura 9. Como se muestra en la tabla 2 el análisis de ANOVA no muestra diferencias estadísticamente significativas entre sus líneas bases de consumo de agua ($F_{3,24} = 0.995$, $P > 0.05$), o durante su fase de adquisición (primera presentación de sacarina) ($F_{3,24} = 0.8147$, $P > 0.05$).

Cuadro 4. Efecto de la aplicación de diferentes antagonistas muscarínicos 20 min antes de la adquisición del CAS.

	Línea Base	Adquisición	CAS	Prueba
	Consumo	Consumo	Consumo	% de Línea base
Vehículo-Ringer	15.1±2.5	14.0±2.9	5.7±1.8	40.3±18.6
Escopolamina	15.2±1.9	13.9±6.1	14.3±4.7	96.5±36.2**
Pirenzepina	14.5±2.8	14.4±4.4	13.9±4.2	98.4±31.3**
AF DX 116	13.0±2.0	12.0±1.8	3.4±3.2	25.5±22.5

**= $p < 0.001$.

En la fase de la evocación (segunda presentación de sacarina), como se puede ver en la tabla 2, el análisis ANOVA muestra diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($F_{3,24}= 11.806, P<0.01$).

El análisis post-hoc muestra que los grupos escopolamina y pirenzepina tienen diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo control - Ringer y al grupo AFDX, ($p < 0.001$, para todos los grupos). Mientras que el grupo de AFDX no tuvo diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo control. Es decir que los únicos grupos que aprendieron el Condicionamiento aversivo a los sabores fueron los grupos de AFDX y el control.

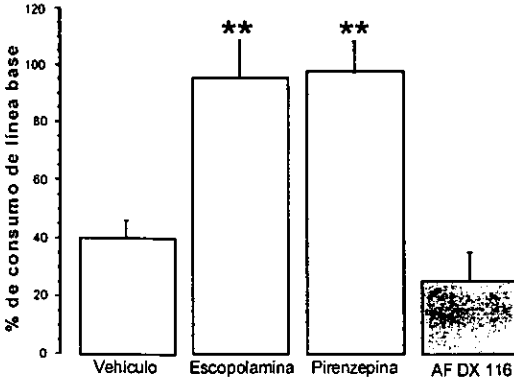
Antagonistas muscarínicos antes de la prueba o evocación del CAS.

La figura 9 muestra los resultados de los grupos en los que se inyectaron los antagonistas muscarínicos en CI antes de la evocación del CAS. El análisis de ANOVA no muestra diferencias significativas entre sus líneas base de consumo de agua ($F_{3,14}= 0.312, P>0.05$) o durante la fase de adquisición ($F_{3,14}= 0.590, P>0.05$).

En la fase de la prueba, el análisis ANOVA muestra que los grupos no tuvieron diferencias significativas entre ellos ($F_{3,14}= 0.664, P>0.05$). Esto quiere decir que todos los grupos aprendieron el Condicionamiento aversivo a los sabores.

Grupo A

Prueba



Grupo B

Prueba

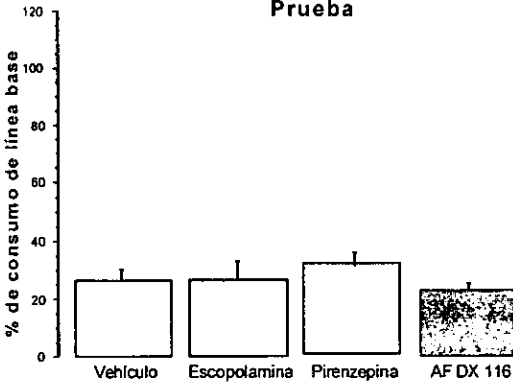


Figura 9. Muestra los resultados del segundo experimento. En la parte superior se observan los resultados de la aplicación de los antagonistas colinérgicos antes de la adquisición (Grupo A), en donde se observaron en la prueba diferencias significativas entre los grupos ($F_{3,24} = 11.806$, $P < 0.01$). El análisis post hoc muestra que los grupos escopolamina, pirenzepina tienen diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo vehículo - Ringer y al grupo AFDX, ($p < 0.001$, para todos los grupos). En la parte inferior se encuentran los resultados de la aplicación de los antagonistas colinérgicos antes de la prueba o evocación (Grupo B). No existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

Con base en los resultados obtenidos, se plantea:

- a) Existen efectos diferenciales en la liberación de ACh en la corteza insular con la utilización de antagonistas específicos para los diferentes receptores muscarínicos. El bloqueo de los receptores m2/m4 produce un incremento significativo en la liberación basal de ACh en la CI.

- b) La aplicación de antagonistas muscarínicos como la escopolamina y la pirenzepina en la corteza insular antes de la adquisición del condicionamiento aversivo a los sabores, interfiere con la formación de la memoria del CAS, mientras el antagonista muscarínico AFDX 116 no la afecta.

- c) No existe ningún efecto con la aplicación de los antagonistas muscarínicos en CI antes de la evocación del condicionamiento aversivo a los sabores.

DISCUSIÓN

Efectos en la liberación de ACh en CI tras la infusión unilateral de antagonistas muscarínicos.

Se ha reportado que en la corteza fronto parietal, la aplicación de atropina y escopolamina (bloqueadores no específicos de los receptores muscarínicos) tienen un incremento en la liberación de ACh, que es significativo en comparación con los grupos controles (43,55). La aplicación de escopolamina, en este trabajo, tuvo una tendencia en la liberación de ACh cortical en las dos fracciones siguientes a la primera manipulación farmacológica que no fue significativamente diferente con el grupo control.

Con la aplicación de pirenzepina (bloqueador m1) se ha observado un incremento en la liberación de ACh cortical (55). En este trabajo, el mismo tratamiento, pero en una corteza diferente (corteza insular) no tuvo ningún efecto en la liberación de ACh. Las diferencias con los tratamientos específicos con pirenzepina y escopolamina de este trabajo con otros experimentos (43,55) pueden deberse a las zonas de exploración y a las concentraciones y dosis utilizadas en cada trabajo, o incluso que en algunas ocasiones las manipulaciones farmacológicas son inyectadas intraperitonealmente. La respuesta dependerá de las concentraciones utilizadas.

El AFDX 116 produjo un incremento en la liberación de ACh extracelular en la corteza insular con una duración de más de una hora, después de la aplicación del fármaco.

Este dato concuerda con los datos publicados en que la aplicación de antagonistas muscarínicos específicos a m2/m4 (AFDX 116, AFDX 384, AQRA 741). por medio de la técnica de microdiálisis, producen una potente estimulación en la liberación de ACh en la corteza parietal de ratas (43,53).

Por tanto, el bloqueo específico en corteza insular de los receptores muscarínicos post sinápticos no tiene efectos en la liberación de ACh cortical, mientras el bloqueo específico de los receptores muscarínicos pre sinápticos elevan los niveles extracelulares de ACh en CI.

Si la escopolamina bloqueara de igual manera la actividad de los cinco tipos de receptores, es fácil suponer que por sí sola provocara una liberación de ACh similar a la observada por un bloqueador específico pre sináptico, dado que el bloqueo post sináptico en esta región no se registra liberación de ACh, la tendencia en la liberación observada en el grupo de escopolamina (ver figura 8, fracciones 4y 5) se debe principalmente al bloqueo de los receptores pre sinápticos (m2).

Efectos de la aplicación de antagonistas muscarínicos en el CAS.

Los estudios realizados en nuestro laboratorio(35) han demostrado que en el consumo de un sabor novedoso, lo cual corresponde a lo que ocurre durante la adquisición del CAS, hay una liberación de ACh en CI, además de que existe una fuerte correlación entre la actividad colinérgica en la corteza y la presentación de un estímulo gustativo

novedoso o familiar. Cuando se presenta un sabor novedoso y se registra por medio de microdiálisis en libre movimiento, se observa una fuerte elevación de los niveles extracelulares de ACh inmediata a la presentación del nuevo estímulo y conforme este estímulo se convierte en familiar, la actividad colinérgica regresa a los niveles obtenidos con el consumo de agua (36). La aplicación de los antagonistas muscarínicos en CI antes de la adquisición del CAS afectan esta liberación.

En el caso de la escopolamina, pese a que hay una tendencia en el incremento en la liberación, la formación de la memoria del CAS no podría completarse adecuadamente dado que los receptores pre y post sinápticos están bloqueados. Con la pirenzepina, el bloqueo de los receptores post sinápticos no permitiría la transmisión sináptica por y tanto la formación del CAS sería interrumpida.

La aplicación bilateral de escopolamina y pirenzepina en la corteza insular bloquearon el condicionamiento aversivo a los sabores cuando fueron inyectados antes de la adquisición y no así cuando fueron inyectados antes de la evocación.

Varios trabajos, han reportado tener una facilitación en tareas como laberintos de 8 brazos (41), laberinto de agua (24), reconocimiento de objetos y prevención pasiva (55) cuando son aplicados antagonistas muscarínicos a m2.

Es probable que el efecto en la liberación, una consecuencia de la aplicación de los antagonistas pre sinápticos, facilite la liberación que se presenta cuando el animal prueba un sabor novedoso, idea que es apoyada por los estudios de Quirión y sus colaboradores

(1995) (44). quienes inyectaron un bloqueador específico a los receptores m2 (BIBN-99) en hipocampo dorsal, y registraron por medio de microdiálisis un incremento en la liberación de ACh. En su tarea conductual (laberinto de agua), demostraron que este bloqueador puede facilitar la ejecución cognitiva en ratas con memoria dañada a consecuencia de la edad o ratas amnésicas con escopolamina: Los autores explican que este efecto podría deberse al bloqueo de los autoreceptores m2 en las terminales colinérgicas, teniendo una facilitación en la liberación pre sináptica que prácticamente eliminó los déficits de la memoria espacial en ratas con amnesia. Siguiendo esta idea, el efecto del AFDX 116 en la CI durante su infusión, antes de la adquisición del CAS, incrementa la liberación producida por el sabor novedoso, aspecto que facilitaría la formación de la memoria del CAS.

Como se había mencionado antes, los receptores muscarínicos m2 son auto receptores que se encargan de la regulación en la sinapsis, encontrándose básicamente en la pre sinapsis, aunque también se han reportado que se encuentran en la post sinapsis en menor cantidad que en la pre sinapsis (32,37).

La aplicación del AFDX 116 en CI antes de la adquisición y la evocación no tuvo ningún efecto en el CAS. La densidad de los receptores del tipo m2 en la post sinapsis es tan baja que la función que realizan es completamente dispensable para el fenómeno estudiado, por lo que su bloqueo con AFDX-116 no tiene efectos sobre la formación de la memoria del CAS.

Dado que el CAS produce una disminución en el consumo de sacarina que puede llegar a 2 o menos mililitros, se alcanza un efecto de piso, es decir que los consumos obtenidos llegan a ser los mínimos necesarios para que el animal reconozca el sabor, esto que podría impedir ver posibles mejorías en el aprendizaje de esta tarea debidas a la inyección de AFDX 116.

Se ha reportado que una forma de observar mejorías en el aprendizaje del CAS es por medio de la curva de extinción (15), es decir, se presenta el estímulo condicionado (sacarina) sin la presencia del estímulo incondicionado. La curva de extinción, será más larga, en aquellos animales con un aprendizaje más fuerte (15), por tanto, necesitara mas presentaciones no pareadas del estímulo condicionado para perder el aprendizaje de la asociación de ambos estímulos. La liberación de ACh provocada por el AFDX no esta mejorando el aprendizaje del CAS, dado que, la curva de extinción de los animales utilizados en este grupo no presenta diferencias con respecto al grupo control-Ringer (resultados no presentados en esta tesis).

Parece evidente que al menos en el CAS, el bloqueo de los receptores pre sinápticos durante la adquisición en CI no tiene ningún efecto en su formación, a pesar de que la aplicación unilateral de un antagonista específico de m2, induce una liberación significativa de ACh y su efecto es observable al menos durante la siguiente hora a la inyección.

En base en lo anterior hay motivos para sugerir que al menos en el CAS no hay una relación directa entre el nivel de actividad colinérgica en la corteza (corteza gustativa en este caso) con la eficiencia del aprendizaje.

Por otra parte, estudios realizados en CI han demostrado que la estimulación tetánica del núcleo basolateral de la amígdala (Bla) induce potenciación a largo plazo (sus siglas en inglés, LTP) en la corteza insular de ratas adultas en vivo (16), además se ha demostrado que la inducción de LTP en la proyección Bla-CI previo al entrenamiento del CAS mejora la retención de esta prueba (15). Estudios preliminares en colaboración con la Dra. Martha Lilia Escobar Rodríguez han demostrado que la aplicación de escopolamina y pirenzepina en la proyección Bla-CI disminuye la expresión de LTP, el AFDX no tiene efectos significativos en la LTP con respecto al grupo control Ringer. Por otra parte, la pirenzepina tiene un mayor efecto con respecto a la escopolamina y entre estos grupos no existen diferencias significativas.

Estos resultados indican que en la LTP en la proyección Bla-CI participan los receptores muscarínicos que se encuentran en la posts sinapsis, y son concordantes con lo obtenido con las manipulaciones conductuales, en donde parece ser que los receptores muscarínicos post sinápticos están jugando un papel importante en procesos de memoria.

El Sistema colinérgico participa en la adquisición pero no en la evocación.

Las lesiones permanentes en la CI con excitotoxinas o lesiones reversibles con TTX (bloqueador reversible de los canales de sodio sensibles a voltaje), afectan tanto la adquisición como la retención de tareas como prevención pasiva y laberinto de agua (6).

Se ha reportado que la administración de TTX en el NBM treinta minutos antes de la adquisición inhibe en CI el aumento en la liberación de ACh durante el consumo del sabor novedoso; también se reportó que aquellos animales tratados con TTX eran incapaces de aprender el CAS (35).

Por otra parte, se ha demostrado que la inhibición de la síntesis de proteínas en la CI durante el tiempo de exposición al sabor novedoso necesario para la adquisición del CAS, bloquea la memoria de esta tarea (46).

Recientemente se reportó que las lesiones en el NBM impiden la adquisición del CAS y del laberinto de agua, pero no afectan la evocación de estas tareas (25), ratificando que al menos en el CAS el sistema colinérgico está jugando un papel diferencial en los procesos de aprendizaje y evocación, siendo indispensable para el primero pero no para el segundo, como se había propuesto anteriormente. (14,35). Los resultados obtenidos en esta tesis aunado a los reportes en donde la aplicación de diversos antagonistas muscarínicos, como atropina y escopolamina (40), indican que el sistema colinérgico está jugando un papel diferencial en los procesos de aprendizaje y evocación.

Sin embargo, los resultados obtenidos en esta tesis contradicen los resultados obtenidos con la aplicación bilateral de la inmunotoxina 192-IgG saporina en el nbM la cual no provoca efecto alguno sobre la adquisición del CAS, a pesar de ocasionar una reducción significativa del 95 % en la actividad de ACh (26).

En vista de los recientes descubrimientos, es probable que otros sistemas de neurotransmisión pueden estar involucrados con los efectos funcionales de los bloqueadores muscarínicos y que no sean afectados con las inmunolesiones con 192IgG-saporina.

Levey y cols. (31) realizaron un estudio en el cual inyectaron en los ventrículos laterales la inmunotoxina 192IgG saporina. localizando inmunocitoquímicamente en el cerebro basal anterior receptores m2 y células positivas a ChAT. Los animales lesionados tuvieron una mayor reducción en neuronas inmunoreactivas a ChAT. sin encontrar efectos en la intensidad o distribución de las neuronas inmunoreactivas a m2. Encontraron que los receptores m2 se encuentran en neuronas colinérgicas como en neuronas no colinérgicas en el CAB, además de que los receptores m2 , particularmente en el complejo MS-DB, reciben contactos sinápticos exclusivamente de terminales axónicas no marcadas para ACh. Ellos sugieren que los receptores m2 intervienen en una compleja combinación de funciones post y pre sinápticas en sistemas colinérgicos y no colinérgicos en el cerebro basal anterior. Además observaron que algunas neuronas colinérgicas no expresan niveles detectables de m2 en sus somas. La inmunoreactividad a m2 fue fácilmente detectable en neuronas no colinérgicas mezcladas con neuronas colinérgicas en el cerebro basal,

proponen que estas neuronas no colinérgicas por su estructura son neuronas GABAérgicas. Mufson y sus colaboradores (38) también sugieren que los receptores muscarínicos m2 juegan un papel importante en sistemas colinérgicos y no colinérgicos.

Además Mrzljak (37) inmunohistoquímicamente identificó en la corteza de monos receptores m2 en la pre sinapsis y en la post sinapsis. Las células marcadas post sinápticamente probablemente son glutamatérgicas con base en su apariencia estructural. Además, se ha demostrado que algunas drogas colinérgicas inhiben la liberación de glutamato por acción vía receptores m2 (34,45), e incluso, se ha observado que la estimulación de los receptores m1 en la corteza frontal media de la rata incrementa los niveles extracelulares de glutamato y GABA(47). Esto hace inminente la participación de los receptores muscarínicos como moduladores de otros sistemas de neurotransmisión.

Por otro lado, cuando se lesiona con la inmunotoxina 192 IgG saporina, el tiempo que se deja pasar entre el día de la lesión y el inicio del entrenamiento conductual varía entre 7 y 15 días, en este tiempo puede haber una reorganización neuronal y esto permitir un procesamiento adecuado de la formación del CAS. En el caso de las inyecciones de los antagonistas muscarínicos, el efecto farmacológico es temporal, dado que se aplican minutos antes del entrenamiento su efecto en los receptores muscarínicos en la post sinapsis impiden la formación de la memoria del CAS.

De este trabajo de tesis se puede concluir que los receptores muscarínicos, particularmente los receptores post sinápticos, participan en el procesamiento de adquisición del aprendizaje del CAS y no en su fase de evocación y al menos en este paradigma no existe una relación directa entre el incremento en la liberación colinérgica en la corteza con la eficiencia de la formación de la memoria.

Bibliografía

1. Anderson JR. Perspectives on Learning and Memory. In J R Anderson, Learning and Memory, 4-5 1995.
2. Baddeley A. Memoria Humana. Teoría y practica. Madrid, España: Mc Graw Hill., 1999.
3. Bartus RT, Dean RL, Beer B, Lippa AS. The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. Science 1982;408-414.
4. Bermudez-Rattoni F. [Neural integration of food habits]. Bol Estud Med Biol 1986;43-50.
5. Bermudez-Rattoni F, Introini-Collison I, Coleman-Meschers K, McGaugh JL. Insular cortex and amygdala lesions induced after aversive training impair retention: effects of degree of training. Neurobiol Learn Mem 1997;57-63.
6. Bermudez-Rattoni F, Yamamoto T. Neuroanatomy of CTA: Lesions studies. Conditioned Taste Aversion. Memory of a special kind. New York: 1998:28-44.
7. Boegman RJ, Cockhill J, Jhamandas K, Beninger RJ. Excitotoxic lesions of rat basal forebrain: differential effects on choline acetyltransferase in the cortex and amygdala. Neuroscience 1992;129-135.

8. Bonner TI, Buckley NJ, Young AC, Brann MR. Identification of a family of muscarinic acetylcholine receptor genes *Science* 1987 Sep 25;237(4822);527-532.
9. Broks P, Preston GC, Traub M, Poppleton P, Ward C, Stahl SM. Modelling dementia: effects of scopolamine on memory and attention. *Neuropsychologia* 1988;685-700.
10. Buxbaum JD, Dudai Y. In vivo protein phosphorylation in *Drosophila* mutants defective in learning and memory. *Neurosci Lett* 1989;351-355.
11. Bymaster FP, Heath I, Hendrix JC, Shannon HE. Comparative behavioral and neurochemical activities of cholinergic antagonists in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1993;16-24.
12. Dunnett SB. The role and repair of forebrain cholinergic systems in short-term memory. Studies using the delayed matching-to-position task in rats. *Adv Neurol* 1993;53-65.
13. Dunnett SB, Everitt BJ, Robbins TW. The basal forebrain-cortical cholinergic system: interpreting the functional consequences of excitotoxic lesions. *Trends Neurosci* 1991;494-501.
14. Durkin TP, Toumane A. Septo-hipocampal and nbM-cortical cholinergic neurons exhibits differential time-courses of activation as a function of both type and duration of spatial memory testing in mice. *Behav Brain Res* 1992;43-52.

15. Escobar ML, Bermudez-Rattoni F. Long-term potentiation in the insular cortex enhances conditioned taste aversion retention. *Brain Res* 2000;208-212.
16. Escobar ML, Chao V, Bermudez-Rattoni F. In vivo long-term potentiation in the insular cortex: NMDA receptor dependence. *Brain Res* 1998;314-319.
17. Everitt BJ, Robbins TW. Central cholinergic systems and cognition. *Annu Rev Psychol* 1997;649-684.
18. Everitt BJ, Robbins TW, Evenden JL, Marston HM, Jones GH, Sirkia TE. The effects of excitotoxic lesions of the substantia innominata, ventral and dorsal globus pallidus on the acquisition and retention of a conditional visual discrimination: implications for cholinergic hypotheses of learning and memory. *Neuroscience* 1987;441-469.
19. Fibiger HC. Cholinergic mechanisms in learning, memory and dementia: a review of recent evidence [see comments]. *Trends Neurosci* 1991;220-223.
20. Flynn DD, Ferrari-DiLeo G, Levey AI, Mash DC. Differential alterations in muscarinic receptor subtypes in Alzheimer's disease: implications for cholinergic-based therapies. *Life Sci* 1995;869-876.
21. Flynn DD, Weinstein DA, Mash DC. Loss of high-affinity agonist binding to M1 muscarinic receptors in Alzheimer's disease: implications for the failure of cholinergic replacement therapies. *Ann Neurol* 1991;256-262.

22. Garcia y Robertson R, Garcia J. X-Rays and Learned Taste Aversions: Historical and psychology ramifications. *Cancer, Nutrition and eating Behavior: A behavioral Perspective*. New York: 1984:11-41.
23. Garcia, J. The evolution of eating safety. *Brain Res* 6, 3-5. 1982.
24. Gill TM, Gallagher M. Evaluation of muscarinic M2 receptor sites in basal forebrain and brainstem cholinergic systems of behaviorally characterized young and aged Long-Evans rats. *Neurobiol Aging* 1998;217-225.
25. Gonzalez C, Miranda MI, Gutierrez H, Ormsby CE, Bermudez-Rattoni F. Differential participation of the NBM in the acquisition and retrieval of conditioned taste aversion and Morris water maze. *Behav Brain Res* 2000;89-98.
26. Gutierrez H, Gutierrez R, Silva-Gandarias R, Estrada J, Miranda MI, Bermudez-Rattoni F. Differential effects of 192IgG-saporin and NMDA-induced lesions into the basal forebrain on cholinergic activity and taste aversion memory formation. *Brain Res* 1999;136-141.
27. Gutierrez H, Hernandez-Echeagaray E, Ramirez-Amaya V, Bermudez-Rattoni F. Blockade of N-methyl-D-aspartate receptors in the insular cortex disrupts taste aversion and spatial memory formation. *Neuroscience* 1999;751-758.

28. Heckers S, Mesulam MM. Two types of cholinergic projections to the rat amygdala. *Neuroscience* 1994;383-397.
29. Kalsner, S. Heteroreceptors, Autoreceptors, and others Terminal Sites. 1-6. 1990. *Annals New York of sciences.*
30. Kandel, E. R, Schwartz, J. H, and Jessell, T. M. *Principles of neural sciences.* third edition, 282. 1999. New York.
31. Levey AI, Edmunds SM, Hersch SM, Wiley RG, Heilman CJ. Light and electron microscopic study of m2 muscarinic acetylcholine receptor in the basal forebrain of the rat. *J Comp Neurol* 1995;339-356.
32. Levey AI, Kitt CA, Simonds WF, Price DL, Brann MR. Identification and localization of muscarinic acetylcholine receptor proteins in brain with subtype-specific antibodies. *J Neurosci* 1991;3218-3226.
33. Lopez-Garcia JC, Fernandez-Ruiz J, Escobar ML, Bermudez-Rattoni F, Tapia R. Effects of excitotoxic lesions of the nucleus basalis magnocellularis on conditioned taste aversion and inhibitory avoidance in the rat. *Pharmacol Biochem Behav* 1993;147-152.

34. Marchi M, Raiteri M. Interaction acetylcholine-glutamate in rat hippocampus: involvement of two subtypes of M-2 muscarinic receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 1989;1255-1260.
35. Miranda MI, Bermudez-Rattoni F. Reversible inactivation of the nucleus basalis magnocellularis induces disruption of cortical acetylcholine release and acquisition, but not retrieval, of aversive memories. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;6478-6482.
36. Miranda MI, Ramírez-Lugo L, Bermudez-Rattoni F. Cortical cholinergic activity is related to the novelty of the stimulus. *Brain Res* 2000;230-235.
37. Mrzljak L, Levey AI, Goldman-Rakic PS. Association of m1 and m2 muscarinic receptor proteins with asymmetric synapses in the primate cerebral cortex: morphological evidence for cholinergic modulation of excitatory neurotransmission. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;5194-5198.
38. Mufson EJ, Jaffar S, Levey AI. m2 muscarinic acetylcholine receptor-immunoreactive neurons are not reduced within the nucleus basalis in Alzheimer's disease: relationship with cholinergic and galaninergic perikarya. *J Comp Neurol* 1998;313-329.
39. Muir JL, Page KJ, Sirinathsinghji DJ, Robbins TW, Everitt BJ. Excitotoxic lesions of basal forebrain cholinergic neurons: effects on learning, memory and attention. *Behav Brain Res* 1993;123-131.

40. Naor C, Dudai Y. Transient impairment of cholinergic function in the rat insular cortex disrupts the encoding of taste in conditioned taste aversion. *Behav Brain Res* 1996;61-67.
41. Packard MG, Regenold W, Quirion R, White NM. Post-training injection of the acetylcholine M2 receptor antagonist AF-DX 116 improves memory. *Brain Res* 1990;72-76.
42. Preston GC, Broks P, Traub M, Ward C, Poppleton P, Stahl SM. Effects of lorazepam on memory, attention and sedation in man. *Psychopharmacology (Berl)* 1988;208-215.
43. Quirion R, Richard J, Wilson A. Muscarinic and nicotinic modulation of cortical acetylcholine release monitored by in vivo microdialysis in freely moving adult rats. *Synapse* 1994;92-100.
44. Quirion R, Wilson A, Rowe W, Aubert I, Richard J, Doods H, Parent A, White N, Meaney MJ. Facilitation of acetylcholine release and cognitive performance by an M(2)-muscarinic receptor antagonist in aged memory-impaired. *J Neurosci* 1995;1455-1462.
45. Raiteri M, Marchi M, Costi A, Volpe G. Endogenous aspartate release in the rat hippocampus is inhibited by M2 'cardiac' muscarinic receptors. *Eur J Pharmacol* 1990;181-187.

46. Rosenblum K, Meiri N, Dudai Y. Taste memory: the role of protein synthesis in gustatory cortex. *Behav Neural Biol* 1993;49-56.
47. Sanz B, Exposito I, Mora F. M1 acetylcholine receptor stimulation increases the extracellular concentrations of glutamate and GABA in the medial prefrontal cortex of the rat. *Neurochem Res* 1997;281-286.
48. Saper CB. Convergence of autonomic and limbic connections in the insular cortex of the rat. *J Comp Neurol* 1982;163-173.
49. Sethy VH, Francis JW. Regulation of brain acetylcholine concentration by muscarinic receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 1988;243-248.
50. Siegel GJ, Agranoff BW, Albers WR, Molinoff PB. Acetylcholine. *Basic Neurochemistry*. 1993;231-260.
51. Singh, B. and Schweitzer, J. B. Loss of p75 nerve growth factor receptor mRNA containing neurons in rat forebrain after intraventricular IgG 192-saporin administration. *Neurosci Lett* 194, 117-120. 1995.
52. Spear NE, Miller JS, Jagielo JA. Animal memory and learning. *Annu Rev Psychol* 1990;169-211.

53. Stillman MJ, Shukitt-Hale B, Galli RL, Levy A, Lieberman HR. Effects of M2 antagonists on in vivo hippocampal acetylcholine levels. *Brain Res Bull* 1996;221-226.
54. Szerb JC, Hadhazy P, Dudar JD. Release of [3H]acetylcholine from rat hippocampal slices: effect of septal lesion and of graded concentrations of muscarinic agonists and antagonists. *Brain Res* 1977;285-291.
55. Vannucchi MG, Scali C, Kopf SR, Pepeu G, Casamenti F. Selective muscarinic antagonists differentially affect in vivo acetylcholine release and memory performances of young and aged rats. *Neuroscience* 1997;837-846.
56. Woolf, N. J. Cholinergic system in mammalian brain and spinal cord. *Prog.Neurobiol.* 37, 475-524. 1991.
57. Yamamoto T, Shimura T, Sako N, Yasoshima Y, Sakai N. Neural substrates for conditioned taste aversion in the rat. *Behav Brain Res* 1994;123-137.